

WHAT IS CLAIMED IS:

1. 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法。
2. 外胚葉細胞が、神経系細胞または表皮系細胞に分化しうる能力を有している細胞である、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法。
4. 外胚葉由来の細胞が、神経系細胞または表皮系細胞である、請求の範囲 3 に記載の方法。
5. 表皮系細胞が表皮細胞である、請求の範囲 4 に記載の方法。
6. 神経系細胞が以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 4 に記載の方法。(a) 神経幹細胞 ;
(b) 神経細胞 ;
(c) 神経管の細胞 ;
(d) 神経堤の細胞。
7. 神経幹細胞が、ネスチンを発現している神経幹細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

8. 神経細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる神経細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

- (a) ドーパミン作動性神経細胞；
- (b) アセチルコリン作動性神経細胞；
- (c) γ アミノ酪酸作動性神経細胞；
- (d) セロトニン作動性神経細胞。

9. アセチルコリン作動性神経細胞が、islet 1 を発現している運動神経細胞である、請求の範囲 8 に記載の方法。

10. 神経管の細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

(a) 神経管の腹側化因子であるソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) に反応し腹側に位置する細胞に分化し、かつ神経管の背側因子である骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) に反応し背側に位置する細胞に分化する能力を有する、背腹軸が決定される前の段階の神経管の細胞；

(b) 神経管の最も腹側の底板に位置する HNF-3 β (Hepatocyte Nuclear Factor-3 β) を発現している神経管腹側の細胞；

(c) 神経管の腹側から HNF-3 β (Hepatocyte Nuclear Factor-3 β) について 2 番目に存在するマーカー Nkx2.2 を発現している神経管腹側の細胞；

(d) Pax-7 を発現している神経管背側の細胞。

11. 神経堤の細胞が、AP-2 (Activator Protein 2) を発現している細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

12. 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) 存在下で培養することの特徴とする、請求の範囲 1~11 のいずれか 1 項に記載の方法。

13. ソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) 存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

14. 非凝集状態が、エンブリオイドボディを介さない状態である、請求の範囲 1～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

15. 無血清培養の条件下で培養する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

16. ストローマ細胞由来の因子の存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

17. ストローマ細胞存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

18. ストローマ細胞が、物理化学的处理により増殖能力を失ったストローマ細胞である、請求の範囲 17 に記載の方法。

19. 物理化学的处理が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる処理である、請求の範囲 18 に記載の方法。

(a) 抗癌剤による処理；

(b) 放射線の照射による処理；

(c) 病理診断で用いられる組織固定のための処理。

20. 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシンおよびメトトレキセートからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求の範囲 19 に記載の方法。

21. 病理診断で用いられる組織固定のための処理が、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定およびオスミウム酸固定からなる群から選ばれる処理である、請求の範囲 19 に記載の方法。

22. ストローマ細胞が、ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体で認識されるストローマ細胞である請求の範囲 16～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

23. ストローマ細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) からなる群から選ばれるストローマ細胞である、請求の範囲 16～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 胎児初代培養繊維芽細胞；
- (b) SIHMマウス由来STO細胞；
- (c) マウス胎児由来NIH/3T3 細胞；
- (d) M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来OP9 細胞；
- (e) マウス頭蓋冠由来MC3T3-G2/PA6 細胞；
- (f) 胚性幹細胞由来のストローマ細胞；
- (g) 骨髓間葉系幹細胞由来のストローマ細胞。

24. 胚性幹細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(b) 体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(c) (a) または (b) の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。

25. 培養工程にレチノイン酸を添加しないことを特徴とする、請求の範囲 1～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

26. 胚性幹細胞を外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導する効率が5%以上である、請求の範囲1～25のいずれか1項に記載の方法。

27. 実質的に中胚葉系細胞の分化誘導を伴わない、請求の範囲 1～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

28. 請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法で用いる、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導するための培地。

29. 胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する、ストローマ細胞由来の因子。

30. ムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 29 に記載の因子。

31. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 30 に記載の因子。

32. 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) を有効成分として含有する、外胚葉細胞から表皮系細胞への分化誘導剤。

33. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を有効成分として含む、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化誘導剤。

34. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 33 に記載の分化誘導剤。

35. ストローマ細胞由来の因子がムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 33 または 34 に記載の分化誘導剤。

36. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 35 に記載の分化誘導剤。

37. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を、ムコ多糖を含む培地中で培養して得られる培養上清を含む培地。

38. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 37 に記載の培養上清を含む培地。

39. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 37 または 38 に記載の培養上清を含む培地。

40. 請求の範囲 37～39 のいずれか 1 項に記載の培養上清を有効成分として含む、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞の分化誘導剤。

41. ストローマ細胞を免疫原として用いることを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

42. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストロ
ーマ細胞である、請求の範囲 41 に記載の方法。

43. 請求の範囲 41 または 42 に記載の方法により取得される、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体。

44. ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体。

45. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、該抗体が認識する抗原を取得する方法。

46. 請求の範囲 45 に記載の方法により取得される、請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体が認識する抗原。

47. 請求の範囲 46 に記載の抗原を含む細胞培養のための培地。

48. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を指標に、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法。

49. ムコ多糖とストローマ細胞由来の因子とを結合させる工程と、ムコ多糖に結合した該ストローマ細胞由来の因子から該因子を回収する工程を含む、請求の範囲 48 に記載の方法。

50. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 48 または 49 に記載の方法。

51. ムコ多糖が、ヘパリンである、請求の範囲 49 に記載の方法。

52. 請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を用いることによって誘導される、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞。

53. 請求の範囲 52 に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞から分化誘導された細胞の純度を高める方法。

54. 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、メトトレキセートおよびアラCからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求の範囲 53 に記載の方法。

55. 請求の範囲 53 または 54 に記載の方法を用いて得られる細胞。

56. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法。

57. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質のスクリーニング方法。

58. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 52 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

59. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 52 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

60. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を含む医薬。

61. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 60 に記載の医薬。

62. 因子がムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 60 に記載の医薬。

63. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 62 に記載の医薬。

64. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を含む医薬。
65. 請求の範囲 46 に記載の抗原を含む医薬。
66. 請求の範囲 52 または 55 に記載の細胞を含む医薬。
67. 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および／または治療のための医薬である、請求の範囲 60～66 のいずれか 1 項に記載の医薬。
68. 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患である、請求の範囲 67 に記載の医薬。
69. 神経系細胞の障害に基づく疾患が、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、または神経毒物の障害に起因する疾患であり、表皮系細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、または乾せんである、請求の範囲 68 に記載の医薬。
70. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲 46 に記載の抗原の免疫学的検出法。
71. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲 46 に記載の抗原の免疫組織染色法。